

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2005-102533

(43)Date of publication of application : 21.04.2005

(51)Int.Cl.

C12P 7/24
C07C 29/141
C07C 31/20
C07C 45/65
C07C 47/22
C07C 51/235
C07C 59/01
C07C 67/39
C07C 69/653
C12P 7/18
C12P 7/40
C12P 7/42
C12P 7/62
// C07B 61/00

(21)Application number : 2003-337663

(22)Date of filing : 29.09.2003

(71)Applicant : NIPPON SHOKUBAI CO LTD

(72)Inventor : TORATANI TETSUO
TOBIMATSU KOSEI
YAMANISHI MAMORU
MORI KOICHI
KAJIURA HIDEKI
YAMADA MORITERU
YUZUKI MICHIO
AZUMA MUNEAKI
HARA TETSUYA
YASUDA SHINZO

(54) METHOD FOR PRODUCING 1,3-PROPANEDIOL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing 1,3-propanediol, by which the 1,3-propanediol can efficiently be produced in high purity.

SOLUTION: This method for producing the 1,3-propanediol comprises dehydrating glycerol with cells and/or a cell treated product which contain a diol dehydratase and/or a glycerol dehydratase, and a diol dehydratase-reactivating factor and/or a glycerol dehydratase-reactivating factor to obtain 3-hydroxypropione aldehyde, and then hydrogenating the 3-hydroxypropione aldehyde in a liquid phase by a chemical synthesis method not using an enzyme to produce the 1,3-propanediol.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

15.05.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(51) Int. Cl. ⁷

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 P 7/24

C 1 2 P 7/24

4 B 0 6 4

C 0 7 C 29/141

C 0 7 C 29/141

4 H 0 0 6

C 0 7 C 31/20

C 0 7 C 31/20

Z

4 H 0 3 9

C 0 7 C 45/65

C 0 7 C 45/65

C 0 7 C 47/22

C 0 7 C 47/22

Z

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全18頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-337663 (P2003-337663)

(22) 出願日 平成15年9月29日 (2003. 9. 29)

(71) 出願人 000004628

株式会社日本触媒

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(74) 代理人 100072349

弁理士 八田 幹雄

(74) 代理人 100110995

弁理士 奈良 泰男

(74) 代理人 100111464

弁理士 齋藤 悦子

(74) 代理人 100114649

弁理士 宇谷 勝幸

(74) 代理人 100124615

弁理士 藤井 敏史

(72) 発明者 虎谷 哲夫

岡山県岡山市宿本町8-50

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 3-プロパンジオールの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 高純度で効率よく1, 3-プロパンジオールを製造できる方法を提供する。

【解決手段】 ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酵素を使用しない化学合成法により水素添加して、1, 3-プロパンジオールを製造することからなる、1, 3-プロパンジオールの製造方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酵素を使用しない化学合成法により水素添加して、1, 3-プロパンジオールを製造することからなる、1, 3-プロパンジオールの製造方法。

【請求項 2】

ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酸化して、3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することからなる、3-ヒドロキシプロピオン酸の製造方法。 10

【請求項 3】

ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを製造することからなる、アクロレインの製造方法。 20

【請求項 4】

ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを得、さらに該アクロレインを液相において酸化してアクリル酸を製造することからなる、アクリル酸の製造方法。

【請求項 5】

ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを得、さらに該アクロレインを液相において酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造することからなる、アクリル酸エステルの製造方法。 30

【請求項 6】

該デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 7】

該デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

該デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニット及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

該菌体処理物は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなるトルエン処理菌体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

該菌体処理物は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる固定化菌体である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、1, 3-プロパンジオールの製造方法ならびにアクリル酸及びアクリル酸エステルの製造方法に関するものである。特に、本発明は、高純度で効率よく1, 3-プロパンジオールを製造できる方法ならびに高純度で効率よくアクリル酸及びアクリル酸エステルを製造できる方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

1, 3-プロパンジオールは、ポリエステル及びポリウレタンの製造に使用されるモノマーとしてならびに環状化合物の合成用出発材料としてなど、広範な用途を有する有用な化合物である。 20

【0003】

1, 3-プロパンジオールの合成方法としては、従来、化学合成による方法および発酵による方法双方が公知である。前者の方法としては、例えば、エチレンオキシドをロジウム触媒を用いてカルボニル化して、1, 3-プロパンジオールを製造する方法（例えば、特許文献 1 ～ 3 参照）や得られた 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを還元して、1, 3-プロパンジオールを製造する方法（例えば、特許文献 4 参照）などが知られている。

【0004】

また、後者の方法は、シトロバクター (Citrobacter)、クロストリジウム (Clostridium)、エンテロバクター (Enterobacter)、イリオバクター (Ilyobacter)、クレブシエラ (Klebsiella)、ラクトバチルス (Lactobacillus)、およびペロバクター (Pelobacter) 等の 1, 3-プロパンジオール産生菌を用いて、グリセロールの発酵から 1, 3-プロパンジオールを製造する方法である。この方法は、脱水酵素によりグリセロールを 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (3-HP) および水に転換する段階及び NAD⁺-リンク-酸化還元酵素により 3-HP を 1, 3-プロパンジオールに還元する段階の 2 段階反応からなる。また、所望の 1, 3-プロパンジオールの収率を上げるために、遺伝子組換え微生物を用いて、グリセリンから 1, 3-プロパンジオールを製造する方法が開示されている（例えば、特許文献 5 ～ 8 参照）。 30

【0005】

一方、アクリル酸は、アクリル繊維共重合体用、あるいはエマルジョンとして粘接着剤 40 に用いられる他、塗料、繊維加工、皮革、建築用材等として広範な用途を有する。アクリル酸の製造方法は、従来公知であり、一般的にプロピレンからアクロレイン、アクロレインからアクリル酸という 2 段階気相接触酸化によって製造される。この際中間材料として使用されるアクロレインは、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下にすることによっても製造される。このため、アクリル酸を高純度でかつ安価に製造するために、アクロレイン、さらには 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを高純度にかつ効率よく製造することが好ましい。

【特許文献 1】米国特許第 4, 873, 378 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 4, 873, 379 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 4, 935, 554 号明細書

50

【特許文献 4】米国特許第 2, 434, 110 号明細書

【特許文献 5】特表 2001-504338 号公報

【特許文献 6】特表 2002-514426 号公報

【特許文献 7】米国特許第 6, 025, 184 号明細書

【特許文献 8】国際公開第 01/12833 号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記 1, 3-プロパンジオールの製造方法のうち、前者の化学合成による方法は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへの転化率及び選択率が不十分であり、副生成物を除去するための精製工程を必要とし、経済的に好ましくない。加えて、また、原料としての 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドが副生成物を含む場合には、次工程の 1, 3-プロパンジオールの製造工程で二次生成物がさらに副生する場合があります、二次生成物の種類によっては、精製が困難になったり、その後この 1, 3-プロパンジオールを原料として用いて繊維を製造した際に繊維等の製品に変色や重合不良をもたらす原因になる恐れがある。このため、1, 3-プロパンジオールの製造における原料として使用される 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドにおける副生成物含量は可能な限り少ないことが望ましい。

【0007】

また、後者の発酵による製造方法は、一般的な発酵によるグリセリンから 1, 3-プロパンジオールへの転化率が 50% 程度と低く、十分ではないという問題がある。このような問題を解消するために、遺伝子組換え微生物を用いた 1, 3-プロパンジオールの製造も報告されているが、このような微生物を用いたとしても、高い転化率を達成することはきわめて困難である。さらに、発酵培養液には、一般的に、培養液中に含まれる栄養素や他の微生物産物などの、多くの副生成物を含む。このため、発酵を用いた方法では、化学合成による以上に精製工程が複雑になり、やはり経済的に好ましくない。上記問題に加えて、上記発酵による方法では、目的産物である 1, 3-プロパンジオールの精製工程において、シクロヘキサン等の有機溶剤が使用される場合が多いが、環境を考慮するとこのような有機溶剤の後処理がさらに必要であるという問題もある。

【0008】

したがって、本発明は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを選択率良くかつ高い転化率で製造でき、このような 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから高純度でかつ高い収率で 1, 3-プロパンジオールを製造する方法を提供することを目的とする。

【0009】

本発明の他の目的は、精製工程に有機溶剤を使用しない 1, 3-プロパンジオールの製造方法を提供することである。

【0010】

本発明のさらなる他の目的は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを選択率良くかつ高い転化率で製造でき、このような 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから高純度でかつ高い収率で、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルを製造する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を行なった結果、グリセリンに、ジオール/グリセロールデヒドラターゼならびにジオール/グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を有する菌体やトルエン処理菌体や固定化菌体を作用させると、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドがグリセリンから高い収率で製造でき、かつグリセリンをほとんど単独で使用するため、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを高純度で製造できるため、このようにして得られた 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において水素添加することによって、所望の 1, 3-プロパンジオールが高純度でかつ高収率で製造できる

ことを知得した。

【0012】

また、本発明者らは、上記したようにしてほとんど副生成物を含まずに得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応させることによって、アクロレインが得られるが、このアクロレインも、出発原料に副生成物がほとんど含んでいないため、高純度で製造でき、ゆえにこのアクロレインからアクリル酸が高純度で製造できることも知得した。加えて、本発明者らは、アクロレインの酸化的エステル化を行なうことによって、アクリル酸エステルが高純度で製造できることも知得した。

【0013】

上記知見に基づいて、本発明を完成した。

10

【0014】

すなわち、上記諸目的は、下記(1)～(10)によって達成される。

【0015】

(1) ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酵素を使用しない化学合成法により水素添加して、1, 3-プロパンジオールを製造することからなる、1, 3-プロパンジオールの製造方法。

【0016】

20

(2) ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酸化して、3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することからなる、3-ヒドロキシプロピオン酸の製造方法。

【0017】

(3) ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを製造することからなる、アクロレインの製造方法。

30

【0018】

(4) ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを得、さらに該アクロレインを液相において酸化してアクリル酸を製造することからなる、アクリル酸の製造方法。

【0019】

40

(5) ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを得、さらに該アクロレインを液相において酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造することからなる、アクリル酸エステルの製造方法。

【0020】

(6) 上記デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因

50

子のスモールサブユニットから構成される、前記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法

【 0 0 2 1 】

(7) 上記デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される、前記 (6) に記載の方法。

【 0 0 2 2 】

(8) 上記デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニット及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される、前記 (7) に記載の方法。 10

【 0 0 2 3 】

(9) 上記菌体処理物は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなるトルエン処理菌体である、前記 (1) ~ (8) のいずれかに記載の方法。

【 0 0 2 4 】

(1 0) 上記菌体処理物は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる固定化菌体である、前記 (1) ~ (9) のいずれ 20
かに記載の方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 5 】

本発明の 1, 3 - プロパンジオールの製造方法は、(1) ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼ (本明細書中では、一括して「ジオール／グリセロールデヒドラターゼ」、または単に「デヒドラターゼ」とも称する) ならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子 (本明細書中では、一括して「ジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子」、または単に「デヒドラターゼ再活性化因子」とも称する) を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、 30

(2) 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酵素を使用しない化学合成法により水素添加することを有することを特徴とするものである。当該方法によると、3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを、発酵法によらずに、即ち、菌体内部のジオール／グリセロールデヒドラターゼ及びジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子をグリセリンに作用させて製造するため、得られる 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物をほとんど含まずに製造できる。さらにこのような方法によると、ほとんどのグリセリンを反応に使用できるため、高い転化率が達成できる。したがって、本発明の方法によると、このようなほとんど副生成物を含まない 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを原料として液相において水素添加することができるため、得られた 1, 3 - プロパンジオールは高純度を有する。上記利点に加えて、反応終了後には、1, 3 - プロパンジオール 40
及び水が主に残るのみであるため、精製に有機溶剤を使用する必要がないため、有機溶剤の回収や後処理が不用であり、また、環境の面でも好ましい。

【 0 0 2 6 】

また、本発明は、上記したようなほとんど副生成物を含まない 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応させてアクロレインを得、さらにアクロレインを酸化してアクリル酸を製造する方法；および上記したようなほとんど副生成物を含まない 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応させてアクロレインを得、さらにアクロレインを酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造する方法に関するものである。当該方法によると、原料たる 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物が少ないため、これを用いて製造されるアクロレイン、さらにこれから製造されるアクリル酸やア 50

クリル酸エステルもまた、高純度を有する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0028】

本発明の第一は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酵素を使用しない化学合成法により水素添加して、1, 3-プロパンジオールを製造することからなる、1, 3-プロパンジオールの製造方法に関するものである 10

【0029】

本発明において、「ジオール／グリセロールデヒドラターゼ」または「デヒドラターゼ」とは、グリセリンを脱水して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド（本明細書中では、「3-HP」とも称する）及び水に変換する触媒作用を有する酵素であり、このような作用を有するものであれば、特に制限されることなく、公知のものが使用できる。これらのうち、酵素の寿命を考慮すると、グリセロールデヒドラターゼが好ましく使用される。

【0030】

本発明において、グリセロールデヒドラターゼは、特に制限されることなく、この酵素 20を有する／発現するいずれの源由来であってもよい。具体的には、*Klebsiella*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Lactobacillus*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属及び*Listeria*属に属する微生物があり、より詳しくは、*Klebsiella pneumoniae*、*Citrobacter pneumoniae*、*Clostridium pasteurianum*、*Lactobacillus leichmannii*、*Citrobacter intermedium*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus brevis*、*Enterobacter agglomerans*、*Clostridium butyricum*、*Caloramator viterbensis*、*Lactobacillus collinoides*、*Lactobacillus hilgardii*、*Salmonella typhimurium*、*Listeria monocytogenes*、及び*Listeria innocua*由来のグリセロールデヒドラターゼなどが挙げられる。これらのグリセロールデヒドラターゼは、単独で使用されてもあるいは2以上の混合物として使用されてもあるいは下記に詳述されるジオールデヒドラターゼと組み 30合わせて使用されてもよい。

【0031】

上記源からグリセロールデヒドラターゼを単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー（例えば、HPLC）等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。

【0032】

また、本発明において、ジオールデヒドラターゼもまた、特に制限されることなく、この酵素を有する／発現するいずれの源由来であってもよい。具体的には、*Klebsiella*属、*Propionibacterium*属、*Clostridium*属、*Lactobacillus*属、*Salmonella*属、*Citrobacter*属、*Flavobacterium*属、*Acetobacterium*属、*Brucella*属、及び*Fusobacterium*属に属する微 40生物があり、より詳しくは、*Klebsiella pneumoniae*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Clostridium glycolicum*、*Lactobacillus brevis*、*Salmonella typhimurium*、*Citrobacter freundii*、*Lactobacillus buchneri*、*Brucella melitensis*、*Fusobacterium nucleatum*、*Klebsiella oxytoca*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Salmonella typhimurium*、*Listeria monocytogenes*、及び*Listeria innocua*由来のジオールデヒドラターゼなどが挙げられる。これらのジオールデヒドラターゼは、単独で使用されてもあるいは2以上の混合物として使用されてもあるいは上記グリセロールデヒドラターゼと組み合わせて使用されてもよい。

【0033】

上記源からジオールデヒドラターゼを単離する方法は、特に制限されることなく、抽出 50

、カラムクロマトグラフィー（例えば、HPLC）等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。

【 0 0 3 4 】

本発明において、「ジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子」または「デヒドラターゼ再活性化因子」とは、グリセリン→3-HP+H₂Oの反応を触媒して失活したデヒドラターゼの活性を再度促す（再活性化する）因子を意味する。より詳細には、デヒドラターゼが触媒するグリセリン→3-HP+H₂Oの反応には、補酵素B12が関与しているが、デヒドラターゼは、グリセリン→3-HP+H₂Oの反応を展開・触媒すると、補酵素B12がつぶれて、活性中心が失活してしまうが、ここでデヒドラターゼ再活性化因子がつぶれた補酵素B12を新たな補酵素B12と置換して、デヒドラターゼの活性を再度促して（再活性化して）、デヒドラターゼをグリセリンの脱水反応に再使用できるようにする。このようにデヒドラターゼを再活性化する作用を有するものを、本発明においては、「ジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子」または「デヒドラターゼ再活性化因子」と称する。このデヒドラターゼ再活性化因子は、上記したような作用を有するものであれば、特に制限されることなく、公知の、不活化したグリセロールデヒドラターゼを活性化するグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び不活化したジオールデヒドラターゼを活性化するジオールデヒドラターゼ再活性化因子が使用される。なお、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子は、上記したもののいずれの組み合わせで使用されてもよい。好ましくは、デヒドラターゼ再活性化因子は、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成され、より好ましくは、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成され、特に好ましくはジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニット及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットから構成される。これらの再活性化因子は、単独で使用されてもあるいは2以上の混合物として使用されてもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明において、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子は、その源は特に制限されることなく、上記したようなグリセロールデヒドラターゼを有する微生物のゲノム上にコードされており、ラージサブユニット及びスモールサブユニットから構成されている。具体的には、*Lactobacillus*属、*Klebsiella*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、及び*Enterobacter*属に属する微生物由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子があり、より詳しくは、*Lactobacillus* sp.、*Klebsiella pneumoniae*、*Lactobacillus leichmannii*、*Citrobacter freundii*、*Citrobacter intermedium*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus brevis*、*Clostridium pasteurianum*、*Enterobacter agglomerans*、及び*Clostridium butyricum*などが挙げられる。これらのうち、*Lactobacillus*に属する微生物、例えば、*Lactobacillus* sp.、*Lactobacillus leichmannii*、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus brevis*由来のものが好ましく使用され、特に*Lactobacillus* sp.及び*Lactobacillus reuteri*由来のものが好ましく使用される。なお、グリセロールデヒドラターゼとグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子との源は、同一であってもあるいは異なるものであってもよい。

【 0 0 3 6 】

上記源からグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー（例えば、HPLC）等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。

【 0 0 3 7 】

また、本発明において、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、その源は特に制限されることなく、上記したようなジオールデヒドラターゼを有する微生物ゲノム上にコード

されており、ラージサブユニット及びスモールサブユニットから構成されている。なお、このジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼ双方を再活性化できるため、本発明においては好ましく使用される。具体的には、*Klebsiella*属、*Citrobacter*属、*Propionibacterium*属、*Lactobacillus*属、*Flavobacterium*属、及び*Acetobacterium*属に属する微生物由来のジオールデヒドラターゼ再活性化因子があり、より詳しくは、*Klebsiella pneumoniae*、*Citrobacter freundii*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus buchneri*、*Flavobacterium* sp.、及び*Acetobacterium* sp.などが挙げられる。これらのうち、*Lactobacillus*に属する微生物、即ち、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus buchneri*、特に*Lactobacillus brevis*由来のジオールデヒドラターゼ再活性化因子が好ましく使用される。なお、ジオールデヒドラターゼとジオールデヒドラターゼ再活性化因子との源は、同一であってもあるいは異なるものであってもよいが、再活性化能が優れるという点で、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットが好ましく使用され、ゆえに、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットならびにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはジオールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットの組み合わせが、より好ましく使用される。

10

【 0 0 3 8 】

上記源からジオールデヒドラターゼ再活性化因子を単離する方法は、特に制限されることなく、抽出、カラムクロマトグラフィー（例えば、HPLC）等の、公知の酵素の分離・単離方法と同様にして、上記したようないずれかの微生物から単離できる。

20

【 0 0 3 9 】

または、デヒドラターゼおよび／またはデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を含む組換え微生物、ならびにデヒドラターゼおよび／またはデヒドラターゼ再活性化因子の活性が向上するように変異をかけられた微生物を、上記デヒドラターゼ／デヒドラターゼ再活性化因子を有する／発揮する微生物源として使用してもよい。このような組換え微生物は、公知の方法を用いることにより作製でき、例えば、デヒドラターゼを発現する微生物としては、具体的には、特表 2 0 0 1 - 5 0 4 3 3 8 号公報、特表 2 0 0 2 - 5 1 4 4 2 6 号公報、特表 2 0 0 1 - 5 0 3 6 3 6 号公報、米国特許第 6, 0 2 5, 1 8 4 号明細書、国際公開第 0 1 / 1 2 8 3 3 号パンフレット、国際公開第 9 6 / 3 5 7 9 5 号パンフレット、国際公開第 0 1 / 0 4 3 2 4 号パンフレット、FEMS Microbiology Letters 164 (1998) 21-28, Applied and Environmental Microbiology, Jan. 1998, p.98-105,

30

Applied and Environmental Microbiology, Dec. 1991, p.3541-3546などに開示されるものがある。また、デヒドラターゼの活性が向上するように変異をかけられた微生物は、公知の方法を用いることにより作製でき、例えば、デヒドラターゼ活性が向上した変異微生物としては、具体的には、国際公開第 0 0 / 7 0 0 5 7 号パンフレットなどに開示されるものがある。

【 0 0 4 0 】

本発明において、ジオール／グリセロールデヒドラターゼならびにジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドを製造する。この際、「菌体」及び「菌体処理物」は、グリセリンを微生物のエネルギー源として用いることがないため、非常に高い転化率を達成することができ、また、得られる 3 - ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物が少ない。本発明では、菌体処理物が好ましく使用される。これは、菌体処理物を使用すると、発酵以外の方法によりグリセリンから 3 - HP への変換が可能であり、高い転化率や低い副生成物含量が達成できるためである。

40

【 0 0 4 1 】

なお、本明細書において、「菌体」とは、本発明による反応後、適当な培地に戻した場合に、その菌体が増殖能を有するか否かは問題ではなく、グリセリンを含む反応系においてグリセリンの資化及びグリセリンをエネルギー源にした増殖を行なわないものをいう。例えば、培養後回収した菌体で本発明による反応中でグリセリンの資化、グリセリンを用

50

いた増殖を行なわないものなどが、本発明による菌体に該当する。より具体的には、適当なホストヘジオール／グリセロールデヒドラターゼ形質およびジオール／グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子形質を導入した組換え菌体などが挙げられる。また、「発酵」とは、グリセリンから3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得る反応系中で、同時に、グリセリンの資化および／またはグリセリンをエネルギー源にした増殖および／またはグリセリンの酸化等を行なう微生物の活動を意味する。このため、本発明において、「発酵以外の方法」とは、グリセリンを含む本発明による反応系でグリセリンの脱水による3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成と同時に、グリセリンの資化およびグリセリンをエネルギー源にした増殖およびグリセリンの酸化を伴わない反応方法を意味する。さらに、「菌体処理物」とは、本発明の反応に使用しやすいように菌体に何らかの処理を行なったものを意味する。具体的には、菌体処理物の例としては、上記したようなデヒドラターゼの固定化物及びデヒドラターゼ再活性化因子の固定化物（例えば、固定化酵素）；上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を含む菌体をトルエン等の有機溶剤で処理したトルエン処理菌体；ならびに上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を有する菌体の固定化菌体などが挙げられる。これらのうち、トルエン処理菌体及び固定化菌体が好ましく使用される。因子の固定化物の製造における固定化方法は、特に制限されることなく、不溶性担体に因子を共有結合、イオン結合、吸着等によって結合させる方法；因子を相互に架橋させる方法；高分子の網目構造の内部に因子を包括する方法などの、公知の方法が使用される。

10

【 0 0 4 2 】

20

また、固定化菌体の製造における固定化方法もまた、特に制限されることなく、上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を有する微生物を不溶性担体に担持する方法；当該微生物をゲルマトリックスで吸収または包括して固定化する方法；内部空間に閉じ込める方法などの、公知の方法が使用される。

【 0 0 4 3 】

さらに、トルエン処理菌体の製造方法もまた、特に制限されることなく、上記したようなデヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を有する微生物に、トルエンを添加、攪拌することによって、因子は菌体外に出ない位の大きさの孔を細胞壁に形成する方法などの、公知の方法が使用される。上記方法においては、トルエン処理菌体を製造するのに、トルエンを使用したか、トルエンの代わりに、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル等の有機溶剤を使用してもよい。これらのうち、トルエンが好ましく使用される。この際、上記有機溶剤の添加量は、菌体に対して、0.1～10質量%、より好ましくは0.2～5質量%である。

30

【 0 0 4 4 】

本発明において、固定化菌体及び固定化因子は、どのような形態で使用されてもよく、具体的には、膜状、粒子状、ひも状、ひだ状などがある。操作の容易性などを考慮すると、ひも状及び粒子状が好ましく使用される。

このように菌体および／または菌体処理物を使用することによって、デヒドラターゼ及びデヒドラターゼ再活性化因子を含む菌体および／または菌体処理物の安定化が図れる；特に菌体処理物を使用する際には、これらの連続反復使用が可能であるという利点に加えて、培養液を使用せずにグリセリンを3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドに簡便に変換できるので、所望の3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの純度及び収率が向上できるという利点がある。

40

【 0 0 4 5 】

本発明において、グリセリンの3-H P への変換方法は、特に制限されず、因子、固定化菌体及び固定化因子を用いて従来公知の物質変換方法と同様の方法が使用できる。本発明によるグリセリンの3-H P への変換は、菌体および／または菌体処理物（例えば、トルエン処理菌体や固定化菌体など）を用いて行なわれるため、発酵法による場合とは異なり、得られる3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドは副生成物をほとんど含まず、さらにほとんどのグリセリンが反応に使用されるため、高い転化率が達成できる。また、従来の

50

化学法に比しても、やはり原料は、ほとんどすべてがグリセリンであるため、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへの転化率及び選択率が非常に高く、また、純度も高いので、副生成物を除去するための精製工程が簡便に行なうことができ、また、経済的に非常に有利である。

【 0 0 4 6 】

本発明において、ジオールデヒドラターゼ及びグリセロールデヒドラターゼを始めとするデヒドラターゼは、上記したように、補酵素 B 1 2 に依存型であり、グリセリンの 3-H P への変換には補酵素 B 1 2 の存在が必須である。グリセリンの 3-H P への変換における補酵素 B 1 2 の存在量は、グリセリンの 3-H P への変換が十分進行する量であれば特に制限されず、基質濃度などによって異なる。補酵素 B 1 2 の存在量は、基質濃度 5 0 m M あたり、補酵素 B 1 2 濃度が 1 ~ 1 0 0 0 μ M、より好ましくは 1 0 ~ 8 0 0 μ M となるような量であることが好ましい。また、菌体および／または菌体処理物の量は、使用される形態（菌体、固定化菌体及び固定化因子）、ならびにこれらの源、基質（グリセリン）濃度及び反応液量などによって異なり、また、グリセリンの 3-H P への変換が十分進行する量であれば特に制限されない。例えば、菌体および／または菌体処理物を回分式で使用する場合には、酵素が、基質 5 0 m m o l あたり、1 0 ~ 1 0 0 万 U、より好ましくは 5 0 ~ 5 0 万 U 程度存在するような量であることが好ましい。また、例えば、固定化菌体を流通反応により使用する場合には、菌体および／または菌体処理物の量は、使用される微生物の種類、酵素の寿命や反応液の流速（L H S V）などによって異なり、また、グリセリンの 3-H P への変換が十分進行する量であれば特に制限されないが、回分式の場合の量に比べておよそ 1 0 ~ 1 0 0 倍量が通常、使用される。すなわち、固定化菌体を流通反応式で使用する場合には、基質 5 0 m m o l あたり、1 0 0 ~ 1 億 U、より好ましくは 5 0 0 ~ 5 0 0 0 万 U 程度存在するような量であることが好ましい。なお、上記酵素の単位は、ジオール／グリセロールデヒドラターゼ酵素活性を示す菌体および／または菌体処理物が 1 分間あたり 1 μ m o l の 1, 2-プロパンジオールをプロピオンアルデヒドに変換できる能力を、「1 U」と定義し、その測定方法は、1, 2-プロパンジオールからのプロピオンアルデヒドの生成が検出可能な方法であれば特に制限されずに使用できる。なお、本発明においては、プロピオンアルデヒド、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成は、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩を用いて検出する方法を用いて検出した。

【 0 0 4 7 】

以下、本発明によるグリセリンの 3-H P への変換の好ましい一実施態様を記載する。例えば、粒子状の固定化菌体および／または固定化因子を使用する場合には、適当な緩衝液（例えば、リン酸カリウムバッファー）、上記したような適当量の補酵素 B 1 2、グリセリンなどを含む混合溶液中に、上記したような適当な酵素が存在するように、当該粒子を入れて、1 0 ~ 9 0 $^{\circ}$ C で、より好ましくは 1 5 ~ 8 5 $^{\circ}$ C で、1 ~ 3 6 0 分間、好ましくは 5 ~ 1 2 0 分間、攪拌することによって、3-H P を形成する。このようにして生成した 3-H P は、粒子上の固定化菌体と混合した状態にあるが、濾過、限外濾過、沈降などの公知の方法によって、固定化菌体と容易に分離できる。または、粒子状の固定化菌体および／または固定化因子を充填したカラムに、適当な緩衝液（例えば、リン酸カリウムバッファー）、上記したような適当量の補酵素 B 1 2、グリセリンなどを含む混合溶液を、1 0 ~ 9 0 $^{\circ}$ C で、より好ましくは 1 5 ~ 8 5 $^{\circ}$ C で、0. 1 ~ 5 0 L H S V の流速で、好ましくは 0. 2 ~ 4 0 L H S V の流速で、流すことによって、3-H P を形成してもよい。この際、グリセリンの濃度は、因子による作用を十分受けられるような濃度であれば特に制限されないが、好ましくは 0. 1 ~ 5 0 (w / v) %、より好ましくは 0. 2 ~ 4 0 (w / v) % である。また、上記方法において、グリセリンを溶解するのに使用される液体は、グリセリンが溶解するものであれば特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸カリウムバッファー、クエン酸カリウムバッファー、リン酸緩衝液、グッドの緩衝液、トリス緩衝液等の、各種緩衝液などが挙げられる。これらのうち、水、リン酸カリウムバッファー、リン酸緩衝液が好ましく使用される。本発明では、酵素活性のために、反

応系中にカリウムイオンが存在することが好ましい。反応系中にカリウムイオンを存在させるために、反応媒体として、リン酸カリウムバッファー、クエン酸カリウムバッファー、その他のカリウム塩水溶液等のカリウム塩を含む緩衝液を使用することが特に好ましい。カリウムイオンの濃度は、特に制限されないが、好ましくは5 mM～1 M、より好ましくは10～500 mMである。

【0048】

本発明の方法によると、このようにして得られた3-H Pは、液相（好ましくは、水溶液中で）化学合成法によってさらに水素添加されて、所望の1, 3-プロパンジオールが形成する。この際、「化学合成法」とは、発酵法によらない化学的な合成方法を意味する。本発明によるように、発酵法によらずに、化学合成法を用いて3-H Pから1, 3-プロパンジオールを製造することによって、所望の1, 3-プロパンジオールの純度及び収率が向上できるという利点がある。3-H Pから1, 3-プロパンジオールを製造するための化学合成法は、特に制限されるものではなく、公知の方法が使用される。例えば、パラジウムカーボンを加え、気相部を水素で置換し、攪拌しながら水素で水素化する方法；30～180℃の温度、5～300バール水素圧力で、pH値2.5～7.0の水溶液中で、酸化物担体上にルテニウムが担持された不均一触媒存在下で3-H Pを水素化する方法（例えば、特表2002-516614号公報）；酸化チタン上に白金が担持された担体触媒上で、水溶液中の5～100重量%濃度の3-H Pを、pH値2.5～6.5で、温度30～180℃及び水素圧5～300バールで、水素添加する方法（例えば、特開平5-213800号公報）；3-H Pを、水溶液中で、PtがTiO₂に担持した触媒やNi/Al₂O₃/SiO₂-触媒等の触媒の存在下に、水素圧5～300バール、pH値2.5～6.5及び温度30～180℃で、接触水素添加する方法（例えば、特開平6-40973号公報）などが挙げられる。

【0049】

本発明の方法によると、1, 3-プロパンジオール及び水が主に生成し、そのほかの副生成物や二次生成物はほとんど存在しない。このため、精製が主に水の除去のみであり、複雑でなく、その後に1, 3-プロパンジオールを原料として用いて繊維を製造した際にも繊維等の製品に変色や重合不良をもたらし恐れがない。この際使用できる1, 3-プロパンジオールの精製方法としては、特に制限されず、公知の精製方法が使用できるが、例えば、蒸留、逆浸透膜等の方法が使用できる。

【0050】

本発明によると、上記と同様にして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酸化することによって、3-ヒドロキシプロピオン酸が製造される。したがって、本発明の第二は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを液相において酸化して、3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することからなる、3-ヒドロキシプロピオン酸の製造方法に関するものである。なお、第二の態様において、グリセリンから3-H Pの製造については、上記第一の態様と同様であるため、ここでは説明を省略する。

【0051】

本発明において、3-H Pから3-ヒドロキシプロピオン酸の製造は、液相で（好ましくは、水溶液中で）3-H Pを酸化することによって、行なわれるが、この際使用される方法は、特に制限されるものではなく、プラチナカーボン、パラジウムカーボン等を使用した方法などの、公知の方法が使用できる。具体的には、パラジウムカーボンを加え、気相部を酸素で置換し、攪拌しながら酸素で酸化する方法；3-H P反応液に触媒として、プラチナカーボンと炭酸水素ナトリウムを入れ、酸素と接触させて反応させる方法などが挙げられる。

【0052】

本発明の方法によると、3-ヒドロキシプロピオン酸が主に生成する。このため、精製が容易である。この際、精製は必ずしも必要ではないが、使用する際の3-ヒドロキシプロピオン酸の精製方法としては、特に制限されず、公知の精製方法が使用できるが、例えば、蒸留、逆浸透膜等の方法が使用できる。

【 0 0 5 3 】

また、本発明によると、上記と同様にして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを酸性条件下で反応することによって、アクロレインが製造される。したがって、本発明の第三は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを製造することからなる、アクロレインの製造方法に関するものである。また、本発明によると、本発明の第三の態様で得られたアクロレインを液相において酸化することによって、アクリル酸が製造される。したがって、本発明の第四は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを得、さらに該アクロレインを液相において酸化してアクリル酸を製造することからなる、アクリル酸の製造方法に関するものである。なお、第三及び第四の態様において、グリセリンから3-HPの製造については、上記第一の態様と同様であるため、ここでは説明を省略する。

【 0 0 5 4 】

本発明において、3-HPからアクロレインの製造は、3-HPを酸性条件下で反応させることによって、容易に達成される。例えば、3-HPを含む溶液に、pHが1～5、好ましくは1.5～4.5となるように、塩酸、硫酸、硝酸等の酸、好ましくは塩酸を、添加・混合した後、5～90℃、好ましくは7～85℃で、1～360分間、好ましくは2～120分間、静置することによって、アクロレインが効率よく製造できる。この工程では、酸以外の成分は使用しないため、副生成物がほとんど存在せず、また、上記反応は高い転化率及び選択率を有するため、アクロレインは、高純度でかつ高収率で製造できる。

【 0 0 5 5 】

本発明において、このようにして形成したアクロレインは、次に触媒の存在下で酸化されて、アクリル酸となる。この際、アクロレインからアクリル酸の製造方法は、特に制限されるものではなく、特開昭64-63543号公報、特開昭63-146841号公報などの、公知の方法が使用できる。具体的には、アクロレインを酸化してアクリル酸とするのに使用される触媒は、特に制限されるものではなく、公知の触媒が単独であるいは組み合わせて使用される。例えば、モリブデンおよびバナジウムを含むものが使用でき、好ましくは一般式 $Mo_a - V_b - W_c - Cu_d - A_e - B_f - C_g - O_x$ （ Mo はモリブデン、 V はバナジウム、 W はタングステン、 Cu は銅、 A はアンチモン、ビスマス、スズ、ニオブ、コバルト、鉄、ニッケルおよびクロムから選ばれる少なくとも一種の元素を表し、 B はアルカリ金属およびアルカリ土類金属から選ばれる少なくとも一種の元素を表し、 C はケイ素、アルミニウム、ジルコニウムおよびチタニウムから選ばれた少なくとも一種の元素を表し、 O は酸素を表し、 a, b, c, d, e, f, g および x は、それぞれ Mo, V, W, Cu, A, B, C および O の原子比を表し、 $a = 12$ としたとき、 $b = 2 \sim 14$ 、 $c = 0 \sim 12$ 、 $d = 0.1 \sim 5$ 、 $e = 0 \sim 5$ 、 $f = 0 \sim 5$ 、 $g = 0 \sim 20$ であり、 x は各元素の酸化状態により定まる値である）で示されるものが例示できる。また、この際使用される触媒の調製方法および混合成形方法もまた、特に限定されるものではなく、一般に用いられている方法および原料を採用することができる。また、触媒の形状についても特に限定されず、球状、円柱状、円筒状などとしことができ、成形方法も担持成形、押

し出し成形、打錠成形などを用いることができ、更に耐火用担体にこれらの触媒物質を担持させた形態のものも有用である。

【 0 0 5 6 】

また、アクロレインからアクリル酸への反応条件もまた特に制限されないが、例えば、アクロレインを、アクリル酸に転化するのに要する酸素及びスチームと混合し、このアクロレイン含有ガスを、反応圧力が常圧から 0.5 MPa の範囲、空間速度 300 ~ 5,000 hr⁻¹ (STP) の範囲で供給し、反応温度は 200 ~ 400 °C、好ましくは 220 ~ 380 °C に制御して行なう。

【 0 0 5 7 】

このようにして得られたアクリル酸は、常法によって回収される。例えば、アクリル酸生成ガスを熱交換器で冷却した後、重合禁止剤を含む捕集溶剤と向流接触させて、アクリル酸水溶液を得、これを抽出、蒸留、共沸蒸留等の方法によって、アクリル酸として単離される。

【 0 0 5 8 】

また、本発明において、上記第三の態様で得られたアクロレインは、次に触媒の存在下で酸化的エステル化されて、アクリル酸エステルとなる。したがって、本発明の第五は、ジオールデヒドラターゼおよび／またはグリセロールデヒドラターゼならびにジオールデヒドラターゼ再活性化因子および／またはグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子を含んでなる菌体および／または菌体処理物を用いて、グリセリンを脱水して 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを得、該 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドから液相中で酸性条件下でアクロレインを得、さらに該アクロレインを液相において酸化的エステル化してアクリル酸エステルを製造することからなる、アクリル酸エステルの製造方法に関するものである。この際、アクロレインからアクリル酸エステルの製造方法は、特に制限されるものではなく、上記アクリル酸の製造において使用されたのと同様の触媒が使用できる。また、アクロレインからアクリル酸エステルへの反応条件もまた特に制限されないが、例えば、上記アクリル酸の製造において使用されたのと同様の条件が使用できる。このようにして得られたアクリル酸エステルは、常法によって回収される。

【実施例】

【 0 0 5 9 】

以下、本発明の実施例により具体的に説明する。

【 0 0 6 0 】

実施例 1

E. coli JM109 をホストとして、pBR322 由来の複製開始点から順に、アンピシリン耐性遺伝子、lacI 遺伝子、tac プロモーターの構成を有するベクター 1 の tac プロモーターの下流側に、Klebsiella pneumoniae ATCC25955 のジオールデヒドラターゼをコードする遺伝子を組み込んだベクター 1 (DD) と、p15A 由来の複製開始点から順に、クロラムフェニコール耐性遺伝子、lacI 遺伝子、tac プロモーターの構成を有するベクター 2 の tac プロモーターの下流側に、同じく Klebsiella pneumoniae ATCC25955 のジオールデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を組み込んだベクター 2 (ddrAddrB) を導入した菌株 JM109/ベクター 1 (DD)/ベクター 2 (ddrAddrB) を、アンピリシン 50 μg/ml、クロラムフェニコール 100 μg/ml を含む LB 培地に接種し、37 °C で 15 時間培養した。この培養液を、アンピリシン 50 μg/ml、クロラムフェニコール 100 μg/ml を含む LB 培地 200 ml に接種し、37 °C で振盪培養した。培養開始後、OD₆₆₀ = 0.8 になった時、1 mM の濃度となるように IPTG を培養液に加え、さらに 5 時間培養した後、培養を停止した。菌体は、遠心分離機にて回収した。回収した菌体を pH 8 の 50 mM リン酸カリウムバッファーで 2 度洗浄し、OD₆₆₀ = 0.2 となるように、pH 8 の 50 mM リン酸カリウムバッファーに懸濁し、この菌体懸濁液を粗酵素液とした。

【 0 0 6 1 】

この粗酵素液 4 ml に、pH 8 の 50 mM リン酸カリウムバッファー 3 ml、2 M グリ 50

セリン 1 ml、0.5 M KCl 1 ml、150 μ M 補酵素 B12 1 ml を加えて、37℃で60分間反応を行なった。反応液の一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なった。反応液に対して1倍量の0.1 M クエン酸カリウムバッファー (pH 3.0) を添加して、反応を停止した。これに、1倍量の水を加え、0.5倍量の0.1% 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩一水和物水溶液を添加し、305 nmの吸光度を測定し、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの濃度を決定した。この結果、反応液中には0.1 Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドが生成した。残りの反応液を濾過し、濾液を蓋つきの試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015 gを加え、気相部を水素で置換し、常圧で500 mlの水素を風船に入れて、気相部に接続して密閉し、攪拌しながら5時間、60℃の湯浴中で反応を行なった。反応液を分析した結果、1, 3-プロパンジオールが0.098 Mの濃度で確認された。

【0062】

実施例 2

E. coli JM109をホストとして、pBR322由来の複製開始点から順に、アンピシリン耐性遺伝子、lacI遺伝子、tacプロモーターの構成を有するベクター1のtacプロモーターの下流側に、Klebsiella pneumoniae ATCC25955のグリセロールデヒドラターゼをコードする遺伝子を組み込んだベクター1 (GD) と、p15A由来の複製開始点から順に、クロラムフェニコール耐性遺伝子、lacI遺伝子、tacプロモーターの構成を有するベクター2のtacプロモーターの下流側に、同じくKlebsiella pneumoniae ATCC 25955のジオールデヒドラターゼ再活性化因子をコードする遺伝子を組み込んだベクター2 (ddrAddrB) を導入した菌株JM109/ベクター1 (GD)/ベクター2 (ddrAddrB) を、アンピリシン50 μ g/ml、クロラムフェニコール100 μ g/mlを含むLB培地に接種し、37℃で15時間培養した。この培養液を、アンピリシン50 μ g/ml、クロラムフェニコール100 μ g/mlを含むLB培地 200 mlに接種し、37℃で振盪培養した。培養開始後、OD₆₆₀ = 0.8になった時、1 mMの濃度となるようにIPTGを培養液に加え、さらに5時間培養した後、培養を停止した。菌体は、遠心分離機にて回収した。回収した菌体をpH 8の50 mMリン酸カリウムバッファーで2度洗浄し、OD₆₆₀ = 0.2となるように、pH 8の50 mMリン酸カリウムバッファーに懸濁した。この懸濁液に、最終濃度が1%となるようにトルエンを加え、ボルテックスミキサーで5分間攪拌した後、遠心分離にて菌体を回収した。菌体を、OD₆₆₀ = 0.2となるように、pH 8の50 mMリン酸カリウムバッファーに懸濁した。この懸濁液を、トルエン処理菌体液とした。

【0063】

このトルエン処理菌体液 4 mlに、pH 8の50 mMリン酸カリウムバッファー 3 ml、2 M グリセリン 1 ml、0.5 M KCl 1 ml、150 μ M 補酵素 B12 1 ml を加えて、37℃で20分間反応を行なった。反応液の一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なった。反応液に対して1倍量の0.1 M クエン酸カリウムバッファー (pH 3.0) を添加して、反応を停止した。これに、1倍量の水を加え、0.5倍量の0.1% 3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン塩酸塩一水和物水溶液を添加し、305 nmの吸光度を測定し、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの濃度を決定した。この結果、反応液中に0.196 Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドが生成したことを確認した。また、グリセリンから3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドへの転化率は、98%であった。残りの反応液を濾過し、濾液を蓋つきの試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015 gを加え、気相部を水素で置換し、常圧で500 mlの水素を風船に入れて、気相部に接続して密閉し、攪拌しながら5時間、60℃の湯浴中で反応を行なった。反応液を分析した結果、1, 3-プロパンジオールが0.196 Mの濃度で確認された。

【0064】

実施例 3

実施例 2と同様にして、0.196 Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド (対グリ

セリン転化率98%)を製造し、これを含む反応液を、35%塩酸でpH2に調整し、1時間、常温にて静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.130Mのアクロレインが生成したことを確認した。

【0065】

実施例4

実施例1と同様にして、0.188Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率94%)を製造し、これを含む反応液を蓋付き試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015gを添加し、気相部を酸素に置換し、常圧で1リットルの酸素を風船に入れて、気相部に接続して密栓し、攪拌しながら、5時間、60℃で反応を行なった。この反応液を分析した結果、0.150Mの3-ヒドロキシプロピオン酸が生成したことを確認した。

10

【0066】

実施例5

実施例2と同様にして、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率98%)を製造し、これを含む反応液10mlを、35%塩酸でpH2に調整し、1時間、常温にて静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.150Mのアクロレインが生成したことを確認した。

【0067】

次に、このようにして得られたアクロレインに、メタノールを加え、酸化触媒として5%パラジウムカーボン0.015gを用いて、良く攪拌しながら、酸素雰囲気下で反応を行なったところ、0.188Mのアクリル酸メチルが生成した。

20

【0068】

実施例6

実施例2と同様にして、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド(対グリセリン転化率98%)を製造し、これを含む反応液を、35%塩酸でpH2に調整し、1時間、常温にて静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.148Mのアクロレイン(対3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド転化率96.9%)が生成したことを確認した。

【0069】

次に、このようにして得られたアクロレインを含む反応液を、蓋付き試験管に入れた後、5%パラジウムカーボン0.015gを添加し、気相部を酸素に置換し、常圧で1リットルの酸素を風船に入れて、気相部に接続して密栓し、攪拌しながら、5時間、60℃で反応を行なった。この反応液を分析した結果、0.120Mのアクリル酸が生成したことを確認した。

30

【0070】

実施例7

Klebsiella pneumoniae ATCC25955を、グリセロールを炭素源にして嫌気培養し、対数増殖期まで増殖させた。この時点の菌体培養液を、実施例2で記載されるのと同様にして、1%トルエン処理した後、集菌した。このようにして集められた*Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 湿重量20g(酵素活性 4000U)の菌体を、135μM 補酵素B 12、0.2Mグリセリンを含む50mMリン酸カリウムバッファー(pH8)1リットルに加え、37℃で120分間反応した。この反応液を濾過した後、その一部をとり、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なったところ、0.196Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成が確認された。このようにして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを、1リットルのセパラブルフラスコに入れ、5%パラジウムカーボン1.5gを加え、気相部を酸素で置換し、気相部にわずかの酸素を流通させて外気の侵入を防ぎ、かつ攪拌しながら、60℃で5時間、反応を行なった。反応液を分析した結果、0.178Mの3-ヒドロキシプロピオン酸を検出した。

40

【0071】

実施例8

50

Klebsiella pneumoniae ATCC25955を、グリセロールを炭素源にして嫌気培養し、対数増殖期まで増殖させた。この時点の菌体培養液を、実施例2で記載されるのと同様にして、1%トルエン処理した後、集菌した。このようにして集められた*Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 湿重量20g (酵素活性 4000U) の菌体を、135 μ M 補酵素B12、0.2Mグリセリンを含む50mMリン酸カリウムバッファー (pH8) 1リットルに加え、37℃で60分間反応した。この反応液を濾過した後、その一部を取り、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの定量を行なったところ、0.197Mの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドの生成が確認された。このようにして得られた3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを含む反応液を、35%塩酸でpH2に調整し、常温で1時間、静置した。得られた反応液中のアクロレインを定量したところ、0.130Mのアクロレインが生成したことを確認した。 10

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明によると、3-HPが高い転化率及び変換率でかつほとんど副生成物を含まずに製造できるので、これから1, 3-プロパンジオール、3-ヒドロキシプロピオン酸、アクロレイン、アクリル酸及びアクリル酸エステルが高い収率及び純度で製造することができる。このため、このようにして製造された1, 3-プロパンジオールは、ポリエステル及びポリウレタンの製造に使用されるモノマーとしてならび環状化合物の合成用出発材料として利用でき、1, 3-プロパンジオールには副生成物がほとんど存在しないので、これを用いて製造された繊維は変色を起こさない。また、このようにして製造されたアクリル酸/アクリル酸エステルは、アクリル繊維共重合体用、あるいはエマルジョンとして粘着剤に用いられる他、塗料、繊維加工、皮革、建築用材等として利用できる。 20

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 C 51/235	C 0 7 C 51/235	
C 0 7 C 59/01	C 0 7 C 59/01	
C 0 7 C 67/39	C 0 7 C 67/39	
C 0 7 C 69/653	C 0 7 C 69/653	
C 1 2 P 7/18	C 1 2 P 7/18	
C 1 2 P 7/40	C 1 2 P 7/40	
C 1 2 P 7/42	C 1 2 P 7/42	
C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
// C 0 7 B 61/00	C 0 7 B 61/00	3 0 0

- (72) 発明者 飛松 孝正
岡山県岡山市西古松 2 3 8 - 1 0 5 西古松住宅 3 - 3 0 3
- (72) 発明者 山西 守
岡山県岡山市津島中 1 - 2 - 2 - 1 0 3
- (72) 発明者 森 光一
岡山県総社市東阿曾 1 4 5
- (72) 発明者 梶浦 英樹
大阪府大阪市東成区大今里 1 - 1 1 - 8
- (72) 発明者 山田 盛輝
千葉県野田市岩名 1 - 2 4 - 7 エメラルドグリーンハイツ F - 2 0 2
- (72) 発明者 柚木 路生
富山県富山市向新庄 1 1 4 - 2 1 ファミーユ新庄 2 0 2
- (72) 発明者 東 宗明
岡山県岡山市尾上 1 6 3 1 - 4
- (72) 発明者 原 哲也
大阪府豊中市柴原町 2 - 6 - 3 - 2 0 1
- (72) 発明者 安田 信三
茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番地 1 2 株式会社日本触媒内

F ターム (参考) 4B064 AC05 AC24 AD32 AD68 CA02 CA21 CB11 CC01 CD06 CD30
DA16
4H006 AA02 AC26 AC41 AC46 AC48 BA25 BA55 BD70 BE20 BE30
BN10 FE11 FG26
4H039 CA60 CB20